

WO9318146

Publication Title:

PROTEINS FORMING COMPLEXES WITH CHAPERONES AND LIGANDS THEREOF, FRAGMENTS THEREOF, PREPARATION THEREOF AND BIOLOGICAL USES THEREOF

Abstract:

Abstract not available for WO9318146

Abstract of corresponding document: FR2688227

Nucleotide sequences capable of hybridizing with the nucleotide sequence shown in figure 1, and the corresponding coded amino acid sequences, are disclosed. Said nucleotide sequences are particularly suitable for detecting complementary sequences in biological samples.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁵ : C12N 15/12, 15/63, 1/21 C07K 13/00, C12P 21/08 C12Q 1/68</p>	A2	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 93/18146</p> <p>(43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00219</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 mars 1993 (04.03.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 92/02612 4 mars 1992 (04.03.92) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR]; 101, rue Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>) : LEBEAU, Marie-Claire [CH/FR]; 100, bd de Port-Royal, F-75005 Paris (FR). MASSOL, Nelly [FR/FR]; 23, rue Vaugirard, F-75013 Paris (FR). RENOIR, Michel [FR/FR]; 6, villa les Roses, F-94240 L'Hay-les-Roses (FR). RADANYI, Christine [FR/FR]; 12, rue de la Galaise, F-94320 Thiais (FR). MORNON, Jean-Paul [FR/FR]; 8, rue du Moncet, F-77220 Favères (FR). CALLEBAUT, Isabelle [BE/BE]; 32, square Larousse, Boite 17, B-1060 Bruxelles (BE). BAULIEU, Etienne-Emile [FR/FR]; 16, rue Bertheaux-Dumas, F-92250 Neuilly-sur-Seine (FR). CHAM-BRAUD, Béatrice [FR/FR]; 48, rue Coriolis, F-75012 Paris (FR).</p>	<p>(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aine, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée</p> <p><i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: PROTEINS FORMING COMPLEXES WITH CHAPERONES AND LIGANDS THEREOF, FRAGMENTS THEREOF, PREPARATION THEREOF AND BIOLOGICAL USES THEREOF</p> <p>(54) Titre: PROTEINES FORMANT DES COMPLEXES AVEC DES CHAPERONES ET LEURS LIGANDS, LEURS FRAGMENTS, LEUR OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES</p>		
<pre> CCG ATC ACC GCG GAG GAA AGT AAA GGG GGC GAG AAC GGG GAG TCG CGC CGC CTC CCC CTC GGG GGC GTG 73 N T A E C H K A A B S O A Q D A P L F L Z G V GAC ATC ACC CCC GAG GAA GAG GAA GGC GTG CTG AAG CTC ATC AAG GUA GAG GGC ACA GCG ACC GAG ACA CCC 144 D I S P E D D R O V L F I E R B O T O T E Y F ATG ATG GCG GAG GAA GTC TTC CTC GAC TAC ACT GCG TGG CTC TTG GAT GCG ACU AAG TTY GAC TCC MYT CTA 217 H I G D R V F V F V N Y T G W L L D G T E R F D S S L GAC CCG AAC GAG AAA TTT TCC TTT GAC CTC GGA AAA GGG GAO CTC ATC AAG OCT TGG GAC ATT GCT GTT GCA 288 D R E D T C T T C D L O R G O E V I E A M D I A V A ACC ATG AAG GTG GCG GAA TTT TGC CCG ATC ACC TGC AAA CCG AAA TAT GCG TAC GGT TCG GCA GCG GGC CCT 360 T H E V D E L G L T C E F E T A T T G S A D G S P CCA AAG ATC CCC CCC AAC GCG ACA CTC GTT GTC GTC GAA TTT GAT AAG GCG GAG GAT GTC ACA 432 F H A F L V F E L F E R F E Q E D L T GAC GAG GAA GAG GCG GAA ATC ATC CTC AAA ATA CCG ACT CAG GGT GAG GCG TAT CCG ACG CCC AAC GAT GGT 504 D D E D G G I I R J R I R Z R G O G T A N D O GCT ATT GCG GTC GCA CTC GAA GCG TAC AAC GAG CCG CTC TTT GAC GAG GCG GAA CTC GCG TTT GAG 576 A I V E V A L G V T T K D N L F D Q R E L A F E GTG GCG GAG CCG GAG AAT CTC GAT CTC CTT TTT GCG GTA GAG AAG GCG ATT CAG CCG ATG GAG AAA GCG GAA 648 V G E G R S L D L P C O L E K A I Q R N E R G E CAT TTT GTC TAC CTC AAC CCC ATC TTC GCG TTT GCG AAT GCT GCG AAA GAA AAT TTT CAG ATC CCG CCA 720 R E I L T L E F S P R G O R E E F O I P P TAT GCT GCG AAA TAT GAA CTC CAG CTC AAC ATY TTT GAG AAG GCG AAG TCG TCG GAG ATG AAG TCG 792 T A S L E F V B L C F E A E A S D S U N S GAG GAG CCG GCG GAG CAG ACC GCG ATC GAA GAG CUA GCG GCG OCT TAT TTT CAG GAG GCG AAC TAC AAG 864 E E L E Q S A I V E N G O T V T P F E O K Y E CAG GCT CTC CTA CAG TAC AAG AAG ATY TTT TCG CTC GAA TAC GAG TCA ACT TTT TCG APT GAG GAG GTO 936 Q A L L Q T Y E T I V M L E T S S D F P S R E V CAA AAG GCA GCG CTC CCG CTC GCG TCC CAC CTC AAG CTC GAT ATY TGT CAG CTC AAG CTA GAG GCG TTC 1008 Q E A Q A L N L A S B L N L A M C B L E L Q A P </pre>		
<p>(57) Abstract</p> <p>Nucleotide sequences capable of hybridizing with the nucleotide sequence shown in figure 1, and the corresponding coded amino acid sequences, are disclosed. Said nucleotide sequences are particularly suitable for detecting complementary sequences in biological samples.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention vise des séquences de nucléotides capables de s'hybrider avec la séquence de nucléotides représentée sur la figure 1, ainsi que les séquences d'acides aminés codées correspondantes. Ces séquences de nucléotides sont utiles notamment pour la détection de séquences complémentaires dans des échantillons biologiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	MI	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROTEINES FORMANT DES COMPLEXES AVEC DES CHAPERONES ET
LEURS LIGANDS, LEURS FRAGMENTS, LEUR OBTENTION ET LEURS
5 APPLICATIONS BIOLOGIQUES.

L'invention a pour objet des protéines
immunophilines, protéines p59 et apparentées, formant des
10 complexes avec des chaperones et leurs ligands.

Elle se rapporte plus particulièrement aux
séquences de nucléotides codant pour des protéines
apparentées à celles de ces complexes, ou à des fragments
de ces protéines, ainsi qu'aux protéines et fragments
15 correspondants.

L'invention concerne également les applications
biologiques de ces séquences de nucléotides et de
protéines, en particulier à des fins de recherche et
d'étude de nouveaux ligands pharmacologiques de
20 l'immunophiline ainsi qu'à des fins de diagnostic clinique.

Par protéine chaperone, on désigne des protéines
associées à d'autres protéines biologiquement actives avec
lesquelles elles interagissent et modifient leur
fonctionnement.

25 L'invention vise en particulier des protéines
formant des complexes avec la chaperone hsp90 qui est une
protéine de choc thermique capable de se lier avec de
nombreux ligands tels que les récepteurs des hormones
stéroïdes, de la vitamine D, et de la dioxine et tels que
30 les tyrosine kinases des oncogènes viraux (par exemple
pp60src), l'actine, la tubuline et d'autres protéines dont
le changement de structure et le trafic intracellulaire
sont importants pour la physiologie et la pathologie de la
cellule.

35 Dans le cadre de travaux sur les récepteurs des
hormones stéroïdes, certains des co-inventeurs de la
présente demande ont décrit la liaison de la hsp90 aux
récepteurs des hormones stéroïdes et son rôle pour empêcher

l'interaction de ces récepteurs avec l'ADN (voir Joab et al., 1984, Nature, 308, 840, 853 et Catelli et al., 1989, EMBO J.4, 3131-3135).

5 Une protéine de poids moléculaire 59kDa a également été caractérisée chez le lapin lors de la purification de ces récepteurs. En l'absence de ligand, les récepteurs de toutes les hormones stéroïdes se retrouvent associés dans la cellule avec d'autres protéines ne liant pas l'hormone, constituant la forme non activée de ces
10 récepteurs. La séparation des protéines libèrera le récepteur lui-même qui pourra alors interagir avec l'ADN (Baulieu et al., 1971, Rec. Progr. Horm. Res. 27, 351-419 et Sherman et al., 1984, Ann. Rev. Physiol. 46, 83-125).

15 Les structures et séquences de ces protéines du type p59 n'ayant pas été élucidées à ce jour, leur fonction dans la cellule n'a pu être définie précisément.

Par criblage d'une banque d'ADN-c de foie de lapin, les inventeurs ont réussi à isoler et à séquencer des clones renfermant une séquence de nucléotides capable
20 de coder pour une protéine homologue à la protéine p59 de lapin telle qu'elle a été définie par son immunoréaction avec l'anticorps monoclonal KN382/EC1. (Nakao et al., 1985, Can. J. Biochem. Cell. Biol. 63, 33-40).

L'invention a donc pour but de fournir de telles
25 séquences de nucléotides ainsi que les séquences d'acides aminés exprimées ou déduites des séquences de nucléotides.

Elle vise également l'obtention de ces différentes séquences.

L'invention a également pour but de fournir les
30 anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre ces protéines ou fragments de protéines obtenus.

Selon un autre aspect, l'invention vise
l'utilisation des séquences de nucléotides ou de protéines, ou des anticorps, dans des applications biologiques, en
35 particulier à des fins de diagnostic.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capable de

s'hybrider dans des conditions stringentes avec une ou plusieurs séquences d'un gène dont l'ADNc présente une séquence correspondant à l'enchaînement (I) de nucléotides.

5 Les enchaînements des séquences de nucléotides et de protéines auxquels il est fait référence dans la description et les revendications sont donnés en fin de description.

10 L'expression "conditions stringentes" telle qu'utilisée dans ce texte signifie qu'on obtient une hybridation en opérant selon les conditions décrites par Sambrook, Fritsch Maniatis dans "Molecular Cloning", 1989.

15 Selon une disposition de l'invention, les séquences de nucléotides sont caractérisées en ce qu'elles contiennent l'information génétique pour coder pour tout ou partie de la protéine répondant à l'enchaînement II.

Des séquences de ce type sont caractérisées en ce qu'elles sont formées, ou qu'elles comprennent, au moins une partie de l'enchaînement I.

20 L'invention vise en particulier des séquences de nucléotides constituées par une partie ou la totalité du cadre ouvert de lecture allant dans l'enchaînement (I) de la position 4 à la position 1380.

Cette séquence, sans la séquence leader, comporte 2067 paires de base.

25 De telles séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour une protéine potentielle de 458 acides aminés répondant à l'enchaînement II.

30 Des séquences de grand intérêt comportent l'information génétique pour coder pour une ou plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II correspondant à une région de cet enchaînement capable de se lier avec un immunosuppresseur du type FK 506 possédant les caractéristiques structurales pour une activité
35 rotamase.

D'autres séquences préférées comportent l'information génétique pour coder pour une ou plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II

correspondant à une région capable de se lier à l'ATP (adénosine triphosphate) / GTP (guanosine triphosphate).

5 D'autres séquences préférées encore comportent l'information génétique pour coder pour une ou plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II correspondant à une région capable de se lier à la calmoduline

10 Selon un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription:

15 De telles séquences renferment avantageusement des séquences codantes pour des chaperones.

20 Des séquences de ce type préférées renferment des séquences codantes pour la hsp90, en particulier pour la région A hydrophile, de cette protéine, fortement chargée négativement (Binart et al., J. Steroid. Biochem. 1989, vol. 34, n° 1, 369-374).

25 Les bases puriques et pyrimidiques des séquences de nucléotides considérées peuvent présenter un ordre différent de celui trouvé dans l'ADNc cloné et/ou le cas échéant, peuvent être substituées. Il est entendu que de telles séquences entrent dans le cadre de l'invention, dès lors qu'un fragment de ces séquences utilisé comme sonde donne lieu à une hybridation avec un gène codant pour des protéines telles que définies ci-dessus.

30 L'invention vise également les ARN et les séquences complémentaires des différents enchaînements nucléotidiques définis ainsi que les protéines codées correspondantes.

35 L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Les souches de microorganismes transformées ou transfectées vont également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que
5 défini précédemment.

L'invention vise également les séquences d'acides aminés déduites, selon le code génétique universel, des séquences de nucléotides définies plus haut, et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.

10 Des séquences selon l'invention, présentant un grand intérêt au regard des applications envisagées en diagnostic, sont caractérisées en ce qu'elles correspondent à des séquences capables de se lier à des protéines de choc thermique ou qu'elles possèdent les propriétés de telles
15 protéines.

Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, il s'agit de séquences capables de se lier à la hsp90, même lorsque la hsp90 est impliquée dans des complexes hétéro-oligomères avec d'autres protéines comme
20 indiqué plus haut. Il peut s'agir de complexes impliqués dans la formation des récepteurs des stéroïdes ou dans d'autres complexes, par exemple avec des oncogènes et des protéines du cytosquelette.

Les complexes de ces séquences protéiques avec la
25 hsp90 ou avec d'autres protéines de choc thermique impliquées dans ces hétéro-oligomères, ou avec des régions de ces différentes protéines, font également partie de l'invention.

Selon une autre disposition de l'invention, le cas
30 échéant prise en combinaison avec au moins l'une de celles qui précèdent, les séquences d'acides aminés sont caractérisées en ce qu'elles possèdent un ou plusieurs domaines du type de la FKBP, identiques ou différents les uns des autres. Les protéines correspondantes seront
35 appelées ci-après protéines HBI, c'est-à-dire protéines du type de l'immunophiline liant les protéines de choc thermique.

La FKBP est une immunophiline liant au moins deux médicaments immunosuppresseurs à savoir le FK506 et la rapamycine.

5 De telles séquences d'acides aminés sont plus spécialement caractérisées en ce qu'elles possèdent les caractéristiques structurales pour une liaison avec un immunosuppresseur du type FK506 et pour une activité peptidyl-prolyl isomérase cis-trans.

10 Les séquences d'acides aminés de l'invention, selon une autre disposition de l'invention, prise le cas échéant en combinaison avec au moins l'une de celles qui précèdent, comportent un site de liaison à l'ATP.

15 Selon un autre aspect, les séquences d'acides aminés de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comportent une séquence consensus de liaison à la calmoduline.

20 Selon encore un autre aspect, les séquences d'acides aminés sont caractérisées en ce qu'elles correspondent aux régions charnières entre deux domaines. Il s'agit plus spécialement de régions hydrophiles, accessibles à des enzymes protéolytiques.

25 Dans une variante de réalisation de l'invention, des séquences d'acides aminés du type FKBP comprennent ou sont formées par un seul des domaines du type FKBP.

Dans une autre variante, elles comprennent ou sont formées par deux de ces domaines, identiques ou différents, reliés par une charnière.

30 Dans une autre variante encore, les séquences d'acides aminés comportent ou sont formées par une pluralité de séquences identiques ou différentes correspondant à l'un des domaines du type FKBP.

35 Dans ces différentes variantes, il s'agit de domaines ayant une très forte homologie de structure tridimensionnelle (3D) avec FKBP de l'ordre de 80 à 100 %, ou de domaines ayant une homologie inférieure, notamment de l'ordre de 35 à 80 %, voire de 25 à 35 % environ.

Les séquences d'acides aminés de l'invention sont également caractérisées en ce qu'elles sont telles

qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

Les protéines ou séquences de l'invention peuvent donc éventuellement se trouver sous forme de protéines de fusion.

La production de ces protéines par un tel procédé fait également partie de l'invention.

Les protéines de l'invention et leurs fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement un épitope des séquences d'acides aminés ci-dessus, ou d'un fragment de ces séquences en donnant lieu à une réaction du type antigène-anticorps, sont également visés par l'invention.

Des anticorps de grand intérêt sont dirigés contre l'un des domaines des protéines HBI et sont donc utiles pour détecter les récepteurs des immunosuppresseurs et peuvent servir à inhiber la fonction exercée par ce domaine.

L'invention vise en outre les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques purifiés, ou d'ARN correspondants, de sondes moléculaires pour rechercher la présence éventuelle dans divers types cellulaires de séquences de nucléotides apparentées au gène capable de coder pour des protéines associées à la hsp90 dans des complexes hétéro-oligomériques comme indiqué plus haut.

L'élaboration de ces sondes comprend, notamment la dénaturation des séquences à double brins pour obtenir une séquence monobrin.

5 Les essais effectués pour détecter la présence de séquences complémentaires dans diverses tumeurs et tissus chez l'homme ou l'animal ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments intragéniques.

10 L'utilisation de ces sondes a ainsi permis de montrer que le gène renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus est exprimé chez les mammifères.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

15 Des substitutions ou altérations de nucléotides peuvent être apportées dans ces séquences, dès lors que la sonde correspondante est capable de s'hybrider avec le gène de la protéine HBI comme défini plus haut.

20 La construction de la sonde est avantageusement effectuée selon les techniques classiques, notamment on utilise un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

25 Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 20 à 40 nucléotides.

Ces sondes sont avantageusement marquées par un groupe permettant leur reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant les nucléotides à étudier.

30 Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec l'échantillon biologique à tester ou leurs acides nucléiques, dans des conditions permettant la réalisation de l'hybridation entre la séquence de nucléotides de la sonde et une séquence complémentaire, lorsqu'elle est contenue dans le produit étudié.

35 On peut, par exemple, avoir recours à la méthode d'hybridation sur taches ou à la méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Dans la première méthode, selon la technique classique, on dépose une

quantité aliquote d'ADN dénaturé sur des membranes de nitrocellulose. La deuxième méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles.

Ces sondes constituent des marqueurs en permettant la détection précoce de l'expression du gène renfermant HBI, c'est-à-dire capable d'exprimer la protéine de l'enchaînement II, qui normalement n'est pas ou peu exprimé dans les tissus normaux correspondants. L'invention fournit ainsi des moyens permettant d'évaluer le développement et/ou la différenciation tumorale.

L'invention vise également un procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences complémentaires de celles définies ci-dessus.

Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- mise en contact de l'échantillon à étudier avec une sonde nucléotidique telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant une hybridation entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée, et
- détection du complexe d'hybridation.

Ce procédé permet une détection rapide et de grande spécificité des ADN et des différentes espèces d'ARNm de transcription.

Il permet notamment le criblage d'une banque de tissus malades, l'étude du développement d'une différenciation tumorale et la détection précoce de l'expression du gène de la protéine HBI.

Le procédé défini ci-dessus de détection in vitro, basé sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, est avantageusement mis en oeuvre à l'aide de kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,

- un milieu approprié à l'hybridation entre la sonde utilisée et la séquence à détecter, et avantageusement,

5 - des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés.

 L'invention vise également les applications immunologiques des séquences d'acides aminés définies ci-dessus, plus spécialement pour l'élaboration d'antisérums spécifiques ainsi que d'anticorps polyclonaux et
10 monoclonaux.

 Les anticorps polyclonaux sont tels qu'induits selon les techniques classiques par injection des séquences d'acides aminés à des animaux, suivie de la récupération des antisérums puis, à partir de ces derniers, si on le
15 souhaite des anticorps, par exemple par chromatographie d'affinité.

 Les anticorps monoclonaux sont produits de manière habituelle en fusionnant des cellules de myélomes avec des cellules de rates d'animaux préalablement immunisés à
20 l'aide des protéines de l'invention. A cet égard, on opère avantageusement selon la technique décrite par Köhler et Milstein dans Nature, vol 256, p 495, 1975.

 Les anticorps de l'invention permettent de détecter in vitro les produits d'expression des séquences
25 nucléotidiques définies plus haut ou ceux des gènes codant pour une protéine de choc thermique apparentée à celles des complexes hétérooligomères définis ci-dessus, notamment des récepteurs de stéroïdes.

 La méthode de dépistage in vitro dans un échantillon biologique de la présence éventuelle de ces
30 produits d'expression est caractérisée en ce qu'elle comprend :

 - la mise en contact de l'échantillon à étudier avec un anticorps selon l'invention, dans des conditions
35 permettant la formation d'un complexe immunologique entre tout ou partie des protéines exprimées par les séquences nucléotidiques et cet anticorps, et

 - la détection du complexe immunologique.

Pour cette méthode de dépistage *in vitro*, on aura recours avantageusement à des kits, comprenant :

- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention,

5 - un milieu approprié à la réalisation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés.

10 Les séquences d'acides aminés définies ci-dessus constituent également des outils de grand intérêt pour l'étude et/ou la régulation des fonctions des protéines associées auxdits complexes.

15 L'invention fournit ainsi des moyens de grande efficacité pour étudier et prévenir ou traiter des pathologies liées au dysfonctionnement des protéines associées aux complexes hétéro-oligomériques évoqués ci-dessus.

20 On citera par exemple les maladies du système immunitaire ou auto-immunes, les cancers, les déficiences en vitamine D responsables de rachitisme, ou en acide rétinoïque ou encore l'intoxication par la dioxine ou produits apparentés.

25 Ces moyens, qu'il s'agisse des polynucléotides, des séquences d'acides aminés ou des anticorps permettent également la localisation des protéines associées aux complexes hétéro-oligomériques décrits plus haut.

30 Il a été ainsi possible de constater que la protéine naturelle associée à la hsp90 dans ces complexes est localisée dans le noyau des cellules de tissus normaux alors que dans les cellules tumorales, elle apparaît de manière abondante dans le cytoplasme. L'utilisation des moyens de l'invention permet donc d'effectuer des différences de localisation significatives de pathologies.

35 Selon un autre aspect de grand intérêt, ils permettent également de trouver des ligands naturels susceptibles d'occuper les sites de liaison reconnus par les immunosuppresseurs.

Les protéines HBI sont utiles pour la recherche de nouveaux réactifs et médicaments se liant à cette protéine, et pouvant influencer le fonctionnement de la protéine de choc thermique et des protéines qui lui sont associées sur des récepteurs des hormones stéroïdes et des autres ligands des récepteurs de la même famille, sur l'activité d'oncogènes ayant une activité protéine kinase, sur la structure et le fonctionnement des protéines du cytosquelette et de toute protéine associée à la hsp90. Il en résulte des applications de grand intérêt dans les domaines endocriniens, cancérologiques et immunologiques.

On rapporte dans les exemples qui suivent d'autres caractéristiques et avantages de l'invention.

Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 7 qui représentent respectivement :

- la figure 1, la séquence d'ADNc de foie de lapin codant pour une protéine HBI et la séquence en acides aminés correspondante,
- la figure 2, les représentations établies par la méthode d'analyse des clusters hydrophobes (ACH) des domaines d'une protéine HBI comparés à la FKBP et à des domaines de type FKBP identifiés dans diverses protéines,
- les figures 3 et 4, les représentations ACH de la FKBP humaine et de la protéine HBI et les alignements des séquences correspondantes d'acides aminés,
- la figure 5, une représentation de la structure des domaines de la pHBI en utilisant comme matrice la chaîne principale de FKBP,
- la figure 6, une représentation schématique des caractéristiques principales de la pHBI,
- la figure 7, un schéma représentant la construction d'une cassette pour la production de fragments de la pHBI, et
- la figure 8, les résultats d'un Western blot réalisé avec un anticorps polyclonal anti-HBI de l'invention.

Exemple 1 : Clonage et séquençage de l'ADNc codant pour une protéine HBI.

Aux fins de clonage d'une banque d'ADNc de foie de lapin, on construit des sondes à partir d'oligonucléotides dont la séquence a été déduite de celle d'un fragment de 19 acides aminés répondant à la séquence :

ALA GLU GLU MET LYS ALA THR GLU SER GLY ALA GLN X ALA
PRO LEU PRO MET GLU

10

Il s'agit du fragment de la partie N-terminale d'une protéine identifiée dans des complexes de récepteurs de stéroïdes non transformés décrite par Sanchez et al. dans Biochemistry 1990, 29, 5145-5152.

15 La construction de la sonde est effectuée en opérant selon l'ouvrage de Maniatis précité Tome 2, chapitre 11 "Synthetic oligonucleotidic probes".

Le criblage de la banque d'ADNc est effectué selon la méthode décrite dans le chapitre 8 de l'ouvrage précité "Construction and analysis of cDNA libraries".

20 L'ADNc du clone positif le plus long est isolé et sous-cloné dans pGEM 7Zf (Promega Biotec), transcrit et traduit dans un système de lysat de réticulocytes de lapin.

La transcription et la traduction sont réalisées comme décrit par le fabricant du plasmide en présence de 35S méthionine.

25 L'ADNc sous-cloné dans le vecteur pGEM 7Zf est digéré par l'exonucléase III pour générer des sous clones de délétion qui sont alors séquencés en utilisant le promoteur de l'ARN polymérase T7 comme amorce. On peut également sous-cloner l'ADNc dans les vecteurs M13 MP 18/19 et séquencer selon la technique classique comme décrit par exemple dans l'ouvrage de Maniatis précité.

30 La séquence de nucléotides et la séquence d'acides aminés dérivée du cadre ouvert de lecture entier sont rapportées sur la figure 1. La séquence soulignée correspond à celle utilisée pour générer l'anticorps polyclonal dont il est question ci-après dans l'exemple 3.

La ligne en pointillés indique la région correspondant au site d'interaction avec la calmoduline.

Exemple 2 : Etude de la protéine HBI, appelée ci-après pHBI, par la méthode d'analyse des clusters hydrophobes (en abrégé ACH)

MATERIEL ET METHODES

10 Les stratégies d'analyses de clusters hydrophobes 2D (ACH) et leurs applications ont été proposées la première fois par Gaboriaud et al., 1987, FEBS Lett. 224, 149, 155 et sont décrites en détail par Lemesle-Varloot et al., 1990, Biochimie, 72, 555-574.

15 ACH constitue une méthode utilisant les principes généraux de repliement des protéines. Elle est basée sur la recherche de correspondances successives de clusters hydrophobes qui sont pertinentes vis-à-vis de la structure secondaire et du repliement 3D des domaines des protéines.

20 Dans les protéines apparentées, il est possible de déduire un alignement de séquences précis à partir des représentations ACH en procédant à partir du noyau hydrophobe de clusters similaires vers des régions liant des clusters (boucles) où les insertions/délétions sont permises.

25 Pour ces alignements HCA, une valeur numérique (score HCA) peut être calculée entre les clusters pour déterminer les alignements.

30 Les études 3D ont été effectuées avec le programme MANOSK (Cherfils et al. 1988, J. Mol. Graph. 6, 155-160) sur Evans & Sutherland PS390.



L'analyse de la pHBI montre qu'elle comporte, en partant de l'extrémité N-terminale, trois domaines successifs.

35 . Identification de domaines immunophilines : domaines pHBI I et pHBI II.

La figure 2 donne alignées, les représentations établies par ACH de la FKBP humaine (FKBPh) et des domaines

I et II de la pHBI. Cette figure mentionne également les domaines de type FKBP déjà identifiés chez d'autres protéines. Il s'agit de la protéine RBP1 liant la rapamycine de *Saccharomyces cerevisiae* (Koltin et al. 1991, Mol. Cell Biol. 11, 1718-1723), la FKBP de *Neurospora crassa* (Tropschug et al. 1990, Nature, 346, 674-677, une séquence cryptique de *Neisseria meningitidis* (Perry et al. 1988, J. Bact. 170, 1691-1697), une protéine de 25,3 kDa de *Pseudomonas aeruginosa* (n° JQ 0140), la protéine de surface cellulaire mip de *Legionella pneumophila* (Engleberg et al. 1989 Inf. Immunity 57, 1263-1270), la protéine L2 de *Chlamydia trachomatis* (Lundemose et al. 1991, Mol. Microbiology 5, 109-115).

Les clusters hydrophobes hachurés mettent en évidence les points d'ancrage pour les alignements de séquences.

La structure secondaire de la FKB h est indiquée au-dessus de sa séquence conformément à la description de la structure 3D. Les feuillets β sont indiqués par les symboles  et les hélices α par .

Les colonnes noires indiquent les résidus conservés, les colonnes grises et avec des pointillés les résidus homologues hydrophobes et hydrophiles et celles ouvertes les particulièrement riches en P, G, S, T et/ou A.

Les acides aminés (chaînes principales et/ou latérales) qui sont essentiels pour la liaison de FK506 à FKBP et sont pleinement conservés pour p59 I sont indiqués par des flèches. On a mentionné des parenthèses lorsque l'alignement entre acides aminés n'est pas possible.

L'analyse de cette figure montre que la pHBI comprend deux domaines successifs d'environ 100 résidus (pHBI I et pHBI II) ayant une forte homologie avec la FKBP.

Le premier domaine présente une identité de séquence de 49 % avec FKBP sans introduction de délétion ou d'insertion.

Le deuxième domaine présente une identité de séquence de 28 % avec FKBP et comprend 4 zones d'insertion ou de délétion totalisant 9 acides aminés.

On attribue à ces domaines, au vu de leur homologie de structure avec FKBP, une topologie de repliement des feuillets β anti-parallèle, accompagnée d'une hélice α et d'un feuillet β supplémentaire.

5 Il est fait référence à ce feuillet β comme étant du type A (chaînes A1 à A5).

Sur la figure 3, on rapporte les représentations graphiques selon ACH de la FKBP humaine et de la pHBI segmentée de manière à montrer sa symétrie interne. Au-dessus de la représentation de la FKBP, on indique comme
10 dans la figure 2, sa structure secondaire.

Les séquences protéiques sont dessinées sur hélice α classique aplatie sur un cylindre, coupé parallèlement à son axe et déroulé pour fournir une représentation à deux
15 dimensions.

La représentation est doublée verticalement pour restaurer un environnement bidimensionnel complet pour chaque acide aminé.

Un groupe d'acides aminés hydrophiles (VILFWMY) sont encerclés en clusters. On utilise le code à lettres classique pour tous les acides aminés, excepté pour P (désigné par une étoile) qui est un interrupteur de clusters, G (désigné par un symbole en forme de diamant) qui montre une grande flexibilité conformationnelle et T et
20 S (carrés ouverts et en pointillés respectivement) qui sont fréquemment rencontrés dans des boucles, mais peuvent être également trouvés dans des environnements hydrophobes où l'hydrophilicité de leurs groupes hydroxyle est neutralisée par des liaisons hydrogène avec les chaînes principales.

30 L'encadré reproduisant la partie N-terminale de la pHBI indique également comment s'effectue de manière linéaire la lecture de la séquence (voir flèche légèrement oblique).

Les lignes verticales délimitent la segmentation des structures (S1 à S6) à l'intérieur des domaines.
35

Les clusters hydrophobes hachurés mettent en évidence les points d'ancrage pour les alignements de séquences.

L'examen de la figure 3 montre que la segmentation classique des domaines globulaires en structures secondaires régulières (feuillets β et hélices α), statistiquement centrés sur les clusters hydrophobes des représentations selon ACH et dans les boucles liant ces structures est nettement conservée pour FKBP, pHBI I et pHBI II.

On constate une similarité globale centrée sur le segment S4, entre pHBI I, pHBI II et un allongement de séquence suivant pHBI II.

Cet allongement est attribué à un troisième domaine globulaire de pHBI (pHBI III).

En utilisant comme points d'ancrage les segments S4, S5 et S6 des représentations graphiques selon ACH des domaines pHBI I et pHBI II, on a procédé à un alignement acide aminé par acide aminé.

Ces alignements sont représentés sur la figure 4.

Les lignes appuyées représentent les limites de noyaux des séquences du troisième domaine de la pHBI (pHBI III) utilisé pour établir statistiquement les alignements.

Leurs dimensions sont de 8, 7, 2, 23, 6, 12 acides aminés pour les comparaisons pHBI III / pHBI II et de 6,8,3,27,7,11 acides aminés pour les comparaisons pHBI III / pHBI I, à savoir respectivement 58 et 62 acides aminés.

Au-dessus et en-dessous, on a indiqué par des cercles pleins et des barres les indentités de séquences et les mutations conservatoires pour pHBI III / pHBI II et pHBI III / pHBI I.

On constate une identité de séquence de 13 % environ entre le domaine pHBI III et pHBI II.

Le domaine pHBI III présente une identité de séquence de 10 % avec le domaine pHBI I.

Une comparaison entre pHBI III et les deux autres domaines de la pHBI permet d'établir une relation entre eux, basée sur les observations suivantes :

- les positions des insertions et des délétions présentes entre les domaines pHBI I et pHBI II sont toutes conservées,

5 - la pHBI III partage également 13 % d'identité de séquence avec la protéine L2 du type FKBP de Chlamydia trachomatis dont la séquence est rapportée sur la figure 2. Dans cette séquence, un allongement de 21 acides aminés (273-293 de pHBI III et 135-152 de L2) présente 45 % d'identité avec pHBI III.

10

Caractéristiques principales des domaines de la pHBI.

15 Il sera fait référence dans ce qui suit aux figures 2 et 3 déjà considérées et à la figure 5 qui donne une représentation de la structure complète de la pHBI I en utilisant comme matrice la chaîne principale de FKBP en forme de ruban (on notera qu'il n'existe pas d'insertions ou de délétions entre les domaines de ces deux protéines). La numérotation des résidus de pHBI I est indiquée de cinq en cinq.

20

Le ligande FK506 lié à FKBP a été conservé comme référence (boules).

25 Les chaînes latérales d'acides aminés qui peuvent être critiques pour une liaison hypothétique d'un ligand similaire à FK506 sont complètement représentées (voir fig. 2).

Les spécificités du domaine pHBI II sont soulignées :

1/ raccourcissement (4 acides aminés) de la boucle de 38-45 (numérotation FKBP),

30 2/ allongement (3 acides aminés) de la boucle 55-56 (site de liaison à l'ATP,

3/ insertion (un acide aminé) dans la boucle 87-90 (stabilisation ATP phosphate),

35 4/ suppression (un acide aminé) dans la boucle 31-35.

pHBI I : On n'observe pas de délétions ou d'insertions dans pHBI I par rapport à FKBP.

Toutes les chaînes principales ou secondaires impliquées dans la liaison de FK506 par FKBP sont conservées dans le domaine de la pHBI I.

En effet, on peut noter que le remplacement de
5 FKBP Q⁵³ par une glycine dans HBI I ne modifie pas l'interaction de la chaîne principale correspondante CO avec le ligand, s'il existe.

De même, le remplacement de H⁸⁷ par une sérine paraît avoir seulement une faible influence puisqu'il
10 interagit par un contact Van der Waals à une distance plutôt longue (3,8-4Å).

Une mutation similaire (alanine) se produit à la même place pour la protéine humaine FKBP13. En conséquence, toutes les exigences de structure reliées au site
15 catalytique de FKBP apparaissent conservées dans pHBI I.

pHBI II : Bien que le domaine de la p59 II soit clairement apparenté à la matrice de FKBP, il présente des caractéristiques spécifiques comme le montrent les figures 2, 3 et 5.

20 1/ 8 des 12 amino-acides essentiels pour la liaison de FK506 à FKBP ne sont pas conservés.

2/ La boucle V⁵⁵ - I⁵⁶ (boucle du type β/α - numérotation FKBP) de FKBP est allongée de 3 acides aminés rendant impossible le maintien de la liaison d'un ligand
25 semblable à FK506, étant donné que ces résidus sont en contact avec le cycle pipicolinyle très important de FK506 (partie la plus profonde du site actif).

3/ La boucle 87-90 (boucle A2-A3) est largement modifiée avec allongement d'un acide aminé et introduction
30 de résidus basiques. (voir symbole en flocons de neige sur la figure 5).

4/ La boucle oméga bien exposée de 38 à 45 (boucle A5- β) est raccourcie de 4 acides aminés (grande étoile), conduisant à un lien direct entre les positions 39 et 45
35 par l'intermédiaire d'une chaîne β continue reliant A5 et β (voir figures 2 et 5).

5/ La boucle 31-35 (boucle A4-A5) est légèrement modifiée par une délétion (G³³ ; petite étoile)

pHBI III : ce domaine partage avec pHBI II la même distribution d'insertions et de délétions par rapport au premier domaine et possède une séquence apparentée de manière significative à ce premier domaine. Cependant, elle est dépourvue de nombreuses caractéristiques de la FKBP qui apparaissent dans les deux premiers domaines. Tous les acides aminés essentiels pour la liaison à FK506 ont été mutés et l'identité de séquence avec FKBP n'est que de 5,7 %.

10 Régions charnières - régions N et C terminales.

Les régions charnières liant les domaines globulaires ci-dessus sont indiqués sur les figures 2, 3 et 6.

15 La figure 6 donne une représentation schématique des caractéristiques principales de structure de la pHBI avec indication des identités de séquence de pHBI II (26 %) et de pHBI I (13 %) par rapport à pHBI I (100 %).

20 Comme le montrent les figures ci-dessus, la charnière 1 relie pHBI I et pHBI II par l'intermédiaire de 10 acides aminés fortement hydrophiles et acides. La charnière 2 relie pHBI II et pHBI III par l'intermédiaire de 13 résidus majoritairement acides.

25 La pHBI comporte une partie N-terminale courte avant pHBI I et est après pHBI III une partie C-terminale plus longue.

Exemple 3 : Obtention de fragments de la pHBI :

30 Etant donné la structure en domaines de la protéine pHBI, son cDNA a été découpé en 4 fragments correspondant aux différents domaines. Ces fragments ont été sous-clonés dans des vecteurs permettant leur expression soit dans E.Coli, soit dans des cellules de mammifères, soit dans un lysat de réticulocytes. La
35 stratégie de découpage permet de recombinaison chaque domaine avec tous les autres.

Les protéines exprimées, correspondant à un, deux ou trois domaines, permettent de déterminer les fonctions

de chaque domaine indépendamment, ainsi que l'influence d'un domaine sur l'autre. L'activité peptidyl-prolyl isomérase de ces protéines tronquées, exprimées sous forme de protéine de fusion avec la glutathion-S- transférase, a été étudiée ainsi que leur liaison aux immunosuppresseurs. Le site d'association de la pHBI avec la protéine de choc thermique hsp90 a été recherché en exprimant ces protéines mutées dans un lysat de réticulocytes ou dans des cellules de mammifères. Il a également été possible de déterminer dans quel domaine se trouve l'épitope de l'anticorps monoclonal KN382 EC-1 dont il est question dans le début de la description. Ces protéines correspondant aux domaines isolés ont des propriétés analogues ou différentes de la FKBP12. Cette dernière ressemble surtout au domaine HBI-1, qui contient un site actif de liaison des immunosuppresseurs. Les domaines de la pHBI pourraient expliquer certains effets secondaires observés *in vivo* lors de l'administration, à des fins immunosuppressives, du FK 506 et de la rapamycine. On mesurera le grand intérêt, tant pharmacologique que thérapeutique, des domaines isolés en tant que réactifs pour étudier ces effets. Les anticorps générés contre les domaines isolés, permettent par exemple d'inhiber une fonction correspondant à l'un ou l'autre domaine.

25

MATERIEL ET METHODES

Dans le cDNA codant pour la protéine pHBI, cloné dans le vecteur pGEM 72f au site Eco RI, 5 sites de restriction ont été introduits par mutagenèse dirigée aux extrémités N et C terminales des différents domaines de la protéine.

Ces sites de restriction ont été choisis de telle façon qu'ils n'existent ni dans le cDNA ni dans le vecteur, qu'ils soient compatibles entre eux, et qu'ils ne changent pas la phase de lecture de la protéine.

Le site Eco RV a été introduit dans la partie N-terminale de la protéine, juste après le codon initiateur

Met ; le site BalI a été introduit dans la partie C terminale de la protéine, juste après l'acide aminé 458 et avant le codon STOP. Les sites HpaI, NruI, et Eco47III ont été introduits respectivement entre les acides aminés 148 et 149, entre 267 et 268 et entre 374 et 375 comme indiqué sur la figure 7.

A partir de cette molécule construite en cassette les différents domaines indépendants ont été obtenus par la technique de sous-clonage classique (voir l'ouvrage "Molecular Cloning" de Sambrook, Fritsch et Maniatis mentionné plus haut). Après hydrolyse de cette molécule cassette par HpaI et BalI, le fragment de 4100 paires de bases correspondant au vecteur pGEM 72f, plus le premier domaine a été ligué et transformé dans E.Coli pour obtenir le premier domaine. Le deuxième domaine a été obtenu en ligant le fragment Hpa I-Nru I de 350 paires de bases avec le fragment Eco RV-Bal I de la molécule cassette. Ce processus a été appliqué à l'obtention des autres domaines.

Les domaines I, II, III, IV ont été ainsi construits de façon indépendante, ainsi que les domaines I+II, III+IV, I+II+III, II+III et II+III+IV (voir figure 7). Les séquences de ces constructions ont été vérifiées (technique de Sanger). Lors de leur expression dans le lysat de réticulocytes de lapin, la taille des protéines obtenues correspondait à cette attente. Certaines de ces constructions ont été sous-clonées au site Eco RI, soit dans le vecteur pGEX λ T (Pharmacia) pour pouvoir les exprimer en grande quantité dans E.Coli comme protéine de fusion avec la glutathion-S-transférase, soit dans le vecteur pSG5 (Stratagene) qui permet une expression transitoire dans des cellules Cos (lignée établie de cellules de rein de singe transformées par SV40).

Exemple 4 : Préparation d'anticorps anti-HBI

On utilise la séquence d'acides aminés de la partie carboxy terminale de l'enchaînement II allant de la position 441 à 458.

Ce fragment peptidique est couplé à KLH et injecté à des lapins selon les techniques habituelles.

Les fractions d'IgG récupérées sont purifiées par précipitation avec du sulfate d'ammonium et chromatographie d'échanges d'ions à chaque saignement.

Les préparations d'anticorps polyclonaux sont utilisées soit pour l'analyse d'immunoblots, soit pour l'analyse de gradient de densité pour étudier leur capacité à reconnaître la pHBI dans différents tissus et espèces, ainsi que dans la structure hétéroooligomérique de la progestérone.

On rapporte les résultats de Western blot sur la figure 8, avec différents échantillons, à savoir du cytosol d'utérus de lapin (piste 1, 10 µl), des cellules d'hépatomes de rat (piste 2) et des cytosols de cellules humaines HeLa (piste 3) soumis à une électrophorèse après chromatographie d'échanges d'ions.

La position des marqueurs est indiquée sur la gauche de la figure. HC désigne les chaînes lourdes d'immunoglobulines de lapin détectées par un deuxième anticorps anti-lapin.

On observe avec l'anticorps anti-HBI utilisé une seule bande à 59 kDa à la même position que celle reconnue par EC1 (voir référence de Nakao et al. ci-dessus).

Cet anticorps réagit également avec la protéine humaine et reconnaît une protéine de la même taille chez le rat, qui n'est pas détectée par EC-1.

Séquences

1 : séquences de nucléotides : enchainement I

10	20	30	40	50	60
GCCATGACCG	CCGAGGAGAT	GAAGGCGGCC	GAGAGCGGGG	CGCAGTCGGC	GCCGCTGCCC
70	80	90	100	110	120
CTCGAGGGCG	TGGACATCAG	CCCCAAGCAA	GACGAAGGCG	TGCTGAAGGT	CATCAAGCGA
130	140	150	160	170	180
GAGGGCACAG	GCACCGAGAC	ACCCATGATC	GGGGACCGAG	TCTTTGTCCA	CTACACTGGC
190	200	210	220	230	240
TGGCTCTTGG	ATGGCACGAA	GTTTGACTCC	AGTCTGGACC	GCAAGGACAA	ATTCTCCTTT
250	260	270	280	290	300
GACCTGGGAA	AAGGGGAGGT	CATCAAGGCT	TGGGACATTG	CTGTTGCAAC	CATGAAGGTG
310	320	330	340	350	360
GGGGAATTGT	GGCGCATCAC	CTGCAAACCC	GAATATGCCT	ACGGTTCGGC	AGGCAGCCCT
370	380	390	400	410	420
CCAAAGATCC	CCCCCAACGC	CACACTTGTG	TTCGAGGTGG	AATTGTTTGA	GTTCAAGGGA
430	440	450	460	470	480
GAGGATCTGA	CAGACGACGA	AGACGGCGGA	ATCATCCGCA	GAATACGGAC	TCGGGGTGAA
490	500	510	520	530	540
GGCTATGCTA	GGCCCAACGA	TGGTGCTATT	GTGGAGGTCG	CACTGGAAGG	GTACTACAAG
550	560	570	580	590	600
GACCGGCTCT	TTGACCAGCG	GGAACTCCGC	TTTGAGGTCG	GCGAGGGGGA	GAGTCTGGAT
610	620	630	640	650	660
CTGCCTTG TG	GGCTAGAGAA	GGCCATT CAG	CGCATGGAGA	AAGGCGAACA	TTCCATCTTG
670	680	690	700	710	720
TACCTCAAGC	CCAGTTACGC	GTTTGGCCAAT	GCTGGGAAGG	AAAAGTTTCA	GATCCCCGCA
730	740	750	760	770	780
TATGCTGAGC	TGAAATATGA	AGTCCACCTC	AAGAGTTTTG	AGAAGGCCAA	GGAGTCCTGG
790	800	810	820	830	840
GAGATGAGCT	CGGAGGAGAA	GCTGGAGCAG	AGCGCCATCG	TGAAAGAGCG	AGGCACCGTG
850	860	870	880	890	900
TACTTCAAGG	AAGGCAAGTA	CAAGCAGGCT	CTGCTACAGT	ACAAGAAGAT	TGTGTCTTGG
910	920	930	940	950	960
CTGGAATACG	AGTCAAGTTT	TTCCAGTGAG	GAAGTGCAAA	AGGCACAGGC	CCTGCGCCTG
970	980	990	1000	1010	1020
GCCTCCCACC	TCAACCTGGC	TATGTGTCAC	CTGAAGCTAC	AGGCCTTCTC	GGCAGCCGTG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAAAGCTGTA	ACAAGGCCCT	GGAAGTGGAC	AGCAACAACG	AGAAGGGCCT	CTTCCGCCGG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GGAGAGGCCC	ACCTGGCTGT	GAACGACTTT	GACCTGGCAC	GGGCTGACTT	CCAGAAGGTC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CTGCAGCTCT	ACCCCAGCAA	CAAAGCGGCT	AAGGCCCAGC	TGGCTGTGTG	CCAGCAGCGG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ATCCGCAAGC	AGATTGCCCG	GGAGAAGAAG	CTCTACGCCA	ACATGTTTGA	GAGGCTGGCA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAGGAGGAGA	ACAAGGCGAA	GGCAGAAGTG	GCCGAGGCG	ACCATCCCAT	GGACACAGAG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATGAAGGATG	AGCGGAACGA	CGTGGCTGGA	AGCCAGTCTC	AGGTGGAGAC	AGAAGCATAG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CCTCTCTGGC	CTGACTCCTG	CGACTGCCCC	CCTCCTGCTC	CCCTGCCCTA	CTCCACCCTG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
TTAGTTTTGT	AAAAACTGAA	GAATTTTGAG	TGACTTAGAC	CTTTATTTTT	CTATCTGGTT

Enchaînement I suite

1510	1520	1530	1540	1550	1560
GGATGGTGGC	TTTGCGAGGA	GGGGGGAAAAG	ACTAGGCTGG	GAACGCTGAG	GTAGGGCTGA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TTCTAGGGAG	TGTCACCCGC	CCCCCTTCCC	CCATCACACG	TGAATGTACA	TCCATCCACA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CACACGCAAC	TGAATGTTCG	TGCATTTTGC	TCCCTCTGTT	AGGTCTACTC	TGCAAATGGT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
AGAAGGGGGC	AAGTGGTGGG	GATGGGGTCT	GATGTGAAAC	CAGGGTGGAG	AGGGAGACCG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACTCCTGGGC	AGCTGCTTTC	CTGATCCTTG	TCCTCTCCCA	GTCCCTTTCA	AACTGTGGCC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TCCAGGTGGG	GGGTGCTGGG	GGTGGGGAAA	CCATTGCTGT	GCCTGTTACC	TCTCAGTCCC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TTCCTCACCC	CAGATGGTGT	GGCTGACTGT	GTCTGGTGTC	CAAGACCACC	CCCGTCCCCC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATTCTGGTAT	TGGCCTTCCT	AGCAGTTTCC	CTTCTCAGCC	AGGTGTATC	CCCACCCTCC
1990	2000	2010	2020	2030	2040
CACCCTGTCA	GCCTCTTCTC	TGCACGTTGC	TGAAAGTCCA	GGCTCGCCTC	AAGTTCTGTG
2050	2060	2070			
CTTGAGCAAT	AAAGTGGAAG	CAATAAAAAA			

2. Séquences d'acides aminés :

enchaînement II

10	20	30
MTAEEMKAAE	SGAQSAPLPL	EGVDISPKQD
40	50	60
EGVLKVIKRE	GTGTETPMIG	DRVFVHYTGW
70	80	90
LLDGTKFDSS	LDRKDKFSFD	LGKGEVIKAW
100	110	120
DIAVATMKVG	ELCRITCKPE	YAYGSAGSPP
130	140	150
KIPP NATLVF	EVELFEFKGE	DLTDDDEDGGI
160	170	180
IRRIRTRGEG	YARPNDGAIV	EVALEGYYKD
190	200	210
RLFDQRELRF	EYGEGESLDL	PCGLEKAIQR
220	230	240
MEKGEHSILY	LKPSYAFGNA	GKEKFQIPPY
250	260	270
AELKYEVLK	SFEKAKESWE	MSSEEKLEQS
280	290	300
AIVKERGT VY	FKEGKYKQAL	LQYKKIVSWL
310	320	330
EYESSFSSEE	VQKAQALRLA	SHLNLAMCHL
340	350	360
KLQAFSAAVE	SCNKALELDS	NNEKGLFRRG
370	380	390
EAHLAVNDFD	LARADFQKVL	QLYPSNKA AK
400	410	420
AQLAVCQORI	RKQIAREKKL	YANMFERLAE
430	440	450
EENKAKAEVA	AGDHPMDTEM	<u>KDERNDVAGS</u>
458		
<u>QSQVETEA</u>		

Exemple 5 : Applications de la protéine pHBI et de ses constituants.

5 . Le fonctionnement de certains récepteurs des hormones stéroïdes peut être modifié par la liaison des immunosuppresseurs à pHBI. (Renoir et al, C.R. Acad. Sci. Paris, t.135, Série III, p 421-428, 1992).

10 La protéine pHBI et ses constituants sont donc utilisables pour rechercher des immunosuppresseurs qui n'interréagissent pas avec HBI. On mesurera l'intérêt de tels résultats qui permettent d'éviter l'effet endocrinien des immunosuppresseurs, comme l'hyperandrogynie avec hirsutisme qui a été observée au cours de traitements immunosuppresseurs.

15 . Le mécanisme des complications cérébrales dues aux immunosuppresseurs est mal connu. Or, en utilisant la pHBI ou ses constituants, on peut détecter des interactions autres que celles de la FKBP12 avec certaines protéines impliquées dans le mécanisme d'action des neurotransmetteurs.

20 . L'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine pHBI ou ses constituants permet de détecter la présence de récepteurs membranaires des immunosuppresseurs et de les localiser (N.A. Cacalano et al, PNAS, 1992, 89, p 4353-4357).

Exemple 6 : Détection d'ARN-m de la protéine pHBI dans divers tions.

30 L'ADN codant pour la protéine pHBI a été utilisé pour détecter la présence de son ARN-m dans divers tissus. Les techniques de Northern suivie d'hybridation ont été utilisées en suivant le protocole décrit dans l'ouvrage de Maniatis précité. La présence d'ARNm de la pHBI a été mise
35 en évidence chez le rat dans le placenta, le coeur, le thymus, la rate, le cerveau et l'utérus. En revanche, dans les conditions de l'expérience, aucune détection n'a pu être effectuée dans le foie de poulet ou de xénopus.

En utilisant un Southern blot commercialisé par Clontech contenant de l'ADN génomique, l'ADN de la pHB1 a été détecté dans le placenta humain, le foie de singe, de souris, de rat, le rein de chien, le foie de bovin et de
5 lapin. Dans les conditions de l'expérience, la détection a été négative chez *S-cerevisiae*.

REVENDEICATIONS

5 1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce
qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un
enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des
conditions stringentes, avec une ou plusieurs séquences
d'un gène dont l'ADNc présente une séquence correspondant à
10 l'enchaînement (I) de nucléotides.

2/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce
qu'elles contiennent l'information génétique pour coder
pour tout ou partie de la protéine répondant à
l'enchaînement II.

15 3/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce
qu'elles sont formées, ou qu'elles comprennent, au moins
une partie de l'enchaînement I.

4/ Séquences de nucléotides selon la revendication
3, constituées par une partie ou la totalité du cadre
ouvert de lecture allant dans l'enchaînement (I) de la
20 position 4 à la position 1380.

5/ Séquences de nucléotides selon la revendication
3, capables de coder pour une protéine potentielle de 458
acides aminés répondant à l'enchaînement II.

25 6/ Séquences de nucléotides selon l'une des
revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles
comportent l'information génétique pour coder pour une ou
plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II
correspondant à une région capable de se lier avec un
30 immunosuppresseur du type FK 506 et possédant les
caractéristiques structurales pour une activité rotamase.

7/ Séquences de nucléotides selon l'une des
revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'elles
comportent l'information génétique pour coder pour une ou
35 plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II,
correspondant à une région capable de se lier à l'ATP/GTP.

8/ Séquences de nucléotides selon l'une des
revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles

comportent l'information génétique pour coder pour une ou plusieurs séquences d'acides aminés de l'enchaînement II correspondant à une région capable de se lier à la calmoduline.

5 9/ Séquence recombinante comprenant l'une des séquences de nucléotides définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la
10 séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription.

 10/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisées en ce qu'elles renferment des séquences codantes pour des protéines chaperones, en particulier des séquences codantes pour la
15 hsp90, notamment pour la région A hydrophile de cette protéine.

 11/ Les ARN et les séquences complémentaires des différents enchaînements nucléotidiques définis dans l'une des revendications 1 à 10, ainsi que les protéines codées
20 correspondantes.

 12/ Vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1
25 à 11, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

 13/ Souches de microorganismes transformées ou transfectées, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins l'une des séquences de nucléotides définies dans
30 l'une des revendications 1 à 11, ou encore un vecteur recombinant tel que défini dans la revendication 12.

 14/ Séquences d'acides aminés déduites, selon le code génétique universel, des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 11 et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.
35

 15/ Séquences d'acides aminés selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des séquences capables de se lier à des

protéines de choc thermique ou qu'elles possèdent les propriétés de ces protéines, et qu'en particulier elles sont des séquences codantes pour des protéines chaperones, en particulier des séquences codantes pour la hsp90, notamment pour la région A hydrophile de cette protéine.

16/ Séquences d'acides aminés selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisées en ce qu'elles possèdent un ou plusieurs domaines du type de la FKBP, identiques ou différents, en particulier qu'elles possèdent les caractéristiques structurales pour une liaison avec un immunosuppresseur du type FK506 et pour une activité rotamase, et/ou qu'elles comportent un site de liaison à l'ATP, et/ou une séquence consensus de liaison à la calmoduline, et/ou qu'elles correspondent aux régions charnières entre deux domaines.

17/ Séquences d'acides aminés selon l'une des revendications 10 à 16, caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant selon la revendication 12, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules, ou directement à partir du milieu de culture.

18/ Les complexes des protéines des séquences d'acides aminés selon l'une des revendications 1, 4 à 17 avec la hsp90 ou avec d'autres protéines de choc thermique impliquées dans ces hétéro-oligomères, ou avec des régions de ces différentes protéines.

19/ Anticorps polyclonaux et monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement les séquences d'acides aminés et les complexes selon l'une des revendications 14 à 18.

20/ Application des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 11 pour l'élaboration de sondes de détection de gènes codant pour des protéines formant des complexes avec des chaperones et leurs ligands.

21/ Procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides

complémentaires de celles définies dans l'une des revendications 1 à 11, comprenant les étapes de

- mise en contact de l'échantillon à étudier avec une sonde nucléotidique élaborée à l'aide d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 11, dans des conditions permettant une hybridation entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée, et
- détection du complexe d'hybridation.

22/ Kits pour la détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides complémentaires de celles définies dans l'une des revendications 1 à 11, caractérisés en ce qu'ils comprennent

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique élaborée à partir d'une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 11,
- un milieu approprié à l'hybridation entre la sonde utilisée et la séquence à détecter, et avantageusement,
- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés.

23/ Méthode de dépistage in vitro dans un échantillon biologique de la présence éventuelle des produits d'expression des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 11 ou ceux des gènes codant pour une protéine de choc thermique, caractérisée en ce qu'elle comprend

- la mise en contact de l'échantillon à étudier avec un anticorps selon la revendication 19, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre tout ou partie des protéines exprimées par les séquences nucléotidiques et cet anticorps, et
- la détection du complexe immunologique.

24/ Kits pour la détection in vitro dans un échantillon biologique de la présence éventuelle des produits d'expression des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 11 ou ceux des gènes codant

pour une protéine de choc thermique, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon la revendication 19,

5 - un milieu approprié à la réalisation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés.

10

1/9

FIGURE 1

GCC ATG ACC GCC GAG GAG ATG AAG CCG GCC GAG AGC GGG GCG CAG TCG GCG CCG CTG CCC CTC GAG GGC GTG 72
 M T A E E M K A A E S G A Q S A P L P L E G V 23
 GAC ATC AGC CCC AAG CAA GAC GAA GGC GTG CTG AAG GTC ATC AAG CGA GAG GGC ACA GGC ACC GAG ACA CCC 144
 D I S P K Q D E G V L K V I K R E G T G T E T P 47
 ATG ATC GGG GAG CGA GTC TTT GTC CAC TAC ACT GGC TGG CTC TTG GAT GGC AGC AAG TTT GAC TCC AGT CTG 216
 M I G D R V F V H Y T G W L L D G T K F D S S L 71
 GAC CGC AAG GAC AAA TTC TCC TTT GAC CTG GGA AAA GGG GAG GTC ATC AAG GCT TGG GAC ATT GCT GTT GCA 288
 D R K D K F S F D L G K G E V I K A W D I A V A 95
 ACC ATG AAG GTG GGG GAA TTG TGC CGC ATC ACC TGC AAA CCC GAA TAT GCC TAC GGT TCG GCA GGC AGC CCT 360
 T M K V G E L C R I T C K P E Y A Y G S A G S P 119
 CCA AAG ATC CCC AAC GCC ACA CTT GTG TTC GAG CTG GAA TTG TTT GAG TTC AAG GGA GAG GAT CTG ACA 432
 P K I P P N A T L V F E V E L F E F K G E D L T 143
 GAC GAC GAA GAC GGC GGA ATC ATC CGC CGA ATA CGG ACT CGG GGT GAA GGC TAT GCT AGG CCC AAC GAT GGT 504
 D D E D G G I I R R I R T R G E G Y A R P N D G 167
 GCT ATT GTG GAG GTC GCA CTG GAA GGG TAC TAC AAG GAC CGG CTC TTT GAC CAG CGG GAA CTC CGC TTT GAG 576
 A I V E V A L E G Y Y K D R L F D Q R E L R F E 191
 GTC GGC GAG CGG GAG AGT CTG GAT CTG CCT TGT GGG CTA GAG AAG GCC ATT CAG CGC ATG GAG AAA GGC GAA 648
 V G E G E S L D L P C G L E K A I Q R M E K G E 215
 CAT TCC ATC TTG TAC CTC AAG CCC AGT TAC CCG TTT GGC AAT GCT GGG AAG GAA AAG TTT CAG ATC CCG CCA 720
 H S I L Y L K P S Y A F G N A G K E K F Q I P P 239
 TAT GCT GAG CTG AAA TAT GAA GTC CAC CTC AAG AGT TTT GAG AAG GCC AAG GAG TCC TGG GAG ATG AGC TCG 792
 Y A E L K Y E V H L K S F E K A K E S W E M S S 263
 GAG GAG AAG CTG GAG CAG AGC GCC ATC GTG AAA GAG CGA GGC ACC GTG TAC TTC AAG GAA GGC AAG TAC AAG 864
 E E K L E Q S A I V K E R G T V Y F K E G K Y K 287
 CAG GCT CTG CTA CAG TAC AAG AAG ATT GTG TCT TGG CTG GAA TAC GAG TCA AGT TTT TCC AGT GAG GAA GTG 936
 Q A L L Q Y K K I V S W L E Y E S S F S S E E V 311
 CAA AAG GCA CAG GCC CTG CGC CTG GCC TCC CAC CTC AAC CTG GCT ATG TOT CAC CTG AAG CTA CAG GCC TTC 1008
 Q K A Q A L R L A S H L N L A M C H L K L Q A F 335

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/9

FIGURE 1 (SUITE)

TCG GCA GCC GTG GAA AGC TGT AAC AAG GCC CTG GAA CTG GAC AGC AAC AAC GAG AAG GGC CTC TTC CGC CGG 1080
 S A A V E S C N K A L E L D S N N E K G L F R R 359
 GGA GAG GCC CAC CTG GCT GTG AAC GAC TTT GAC CTG GCA CGG GCT GAC TTC CAG AAG GTC CTG CAG CTC TAC 1152
 G E A H L A V N D F D L A R A D F Q K V L Q L Y 383
 CCC AGC AAC AAA GCG GCT AAG GCC CAG CTG GCT GTG TGC CAG CAG CGG ATC CGC AAG CAG ATT GCC CGG GAG 1224
 P S N K A A K A Q L A V C Q Q R I R K Q I A R E 407
 AAG AAG CTC TAC GCC AAC ATG TTT GAG AGG CTG GCA GAG GAG GAG AAC AAG GCG AAG GCA GAA CTG GCC GCA 1296
 K K L Y A N M F E R L A E E N K A K A E V A A 431
 GGC GAC CAT CCC ATG GAC ACA GAG ATG AAG GAT GAG CGG AAC GAC GTG GCT GGA AGC CAG TCT CAG GTG GAG 1368
 G D H P M D T E M K D E R N D V A G S Q S Q V E 455
 ACA GAA GCA TAG CCTCTCTGGCCCTGACTCCTGCGACTGCCCGCCCTCCTGCTCCCTGCTCCCTACTCCACCCCTGTAGTTTGT 1450
 T E A * 459
 AAAAACTGAAGAAATTTGAGTGACCTTAGACCTTTATTTTCTATCTGGTTGGATGGTGGCTTTGCGAGGAGGGGGGAAAGACTA 1534
 GGCTGGGAAACGCTGAGGTAGGGCTGATTTCTAGGGAGTGTCACCCGCCCCCTTCCCCCATCACACGCGAATGTACATCCATCCA 1618
 CACACACGCCAACTGAATGTTTCGTGCAATTTTGTCTCCCTCTGTTAGGTCTACTCTGCAAAATGGTAGAAGGGGGCAAGTGGTGGGA 1702
 TGGGGTCTGATGTGAACACAGGGTGGAGAGGGAGACCGACTCCTGGGAGAGTCTTTCTCTGATCCTTGTCTCTCCAGTCCCT 1786
 TTCAAACTGTGGCCCTCCAGGTGGGGGTGCTGGGGGTGGGGAACCAATTGCTGCTGCTGTACCTCTCAGTCCCTTCTCTCACCC 1870
 CAGATGGTGTGGCTGACTGTGTCTGGTGTCCAAAGACACCCCGTCCCGCATTTCTGGTATTTGGCCCTTCTTAGCAGTTTCCCTTC 1954
 TCAGCCAGGTTGTATCCCCACCCCTCCACCCCTGTGACGCTCTTCTCTGACGTTGCTGCAAAAGTCCAGGCTCGCCCTCAAGTTCTG 2038
 TGCTTGAGCAATAAAGTGAACAAATAAAAAA 2070

FIGURE 2

hFKBP

HBI-I

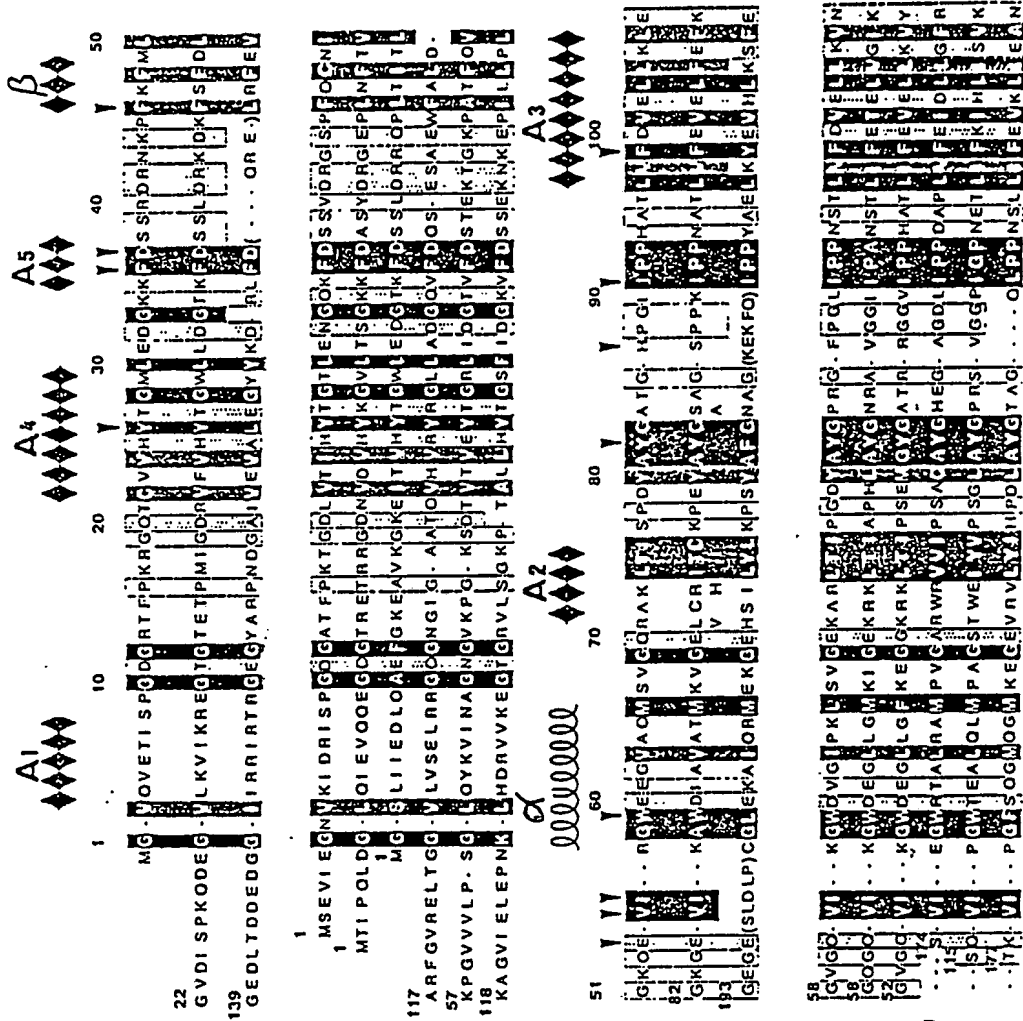
HBI-II

*RBP1 (S.cerevisiae)**FKBP (N.crassa)**C114 (N.meningitidis)**hyp. 25,3 kd (P.aeruginosa)**mip (L.pneumophila)**L2 (C.trachomatis)*

hFKBP

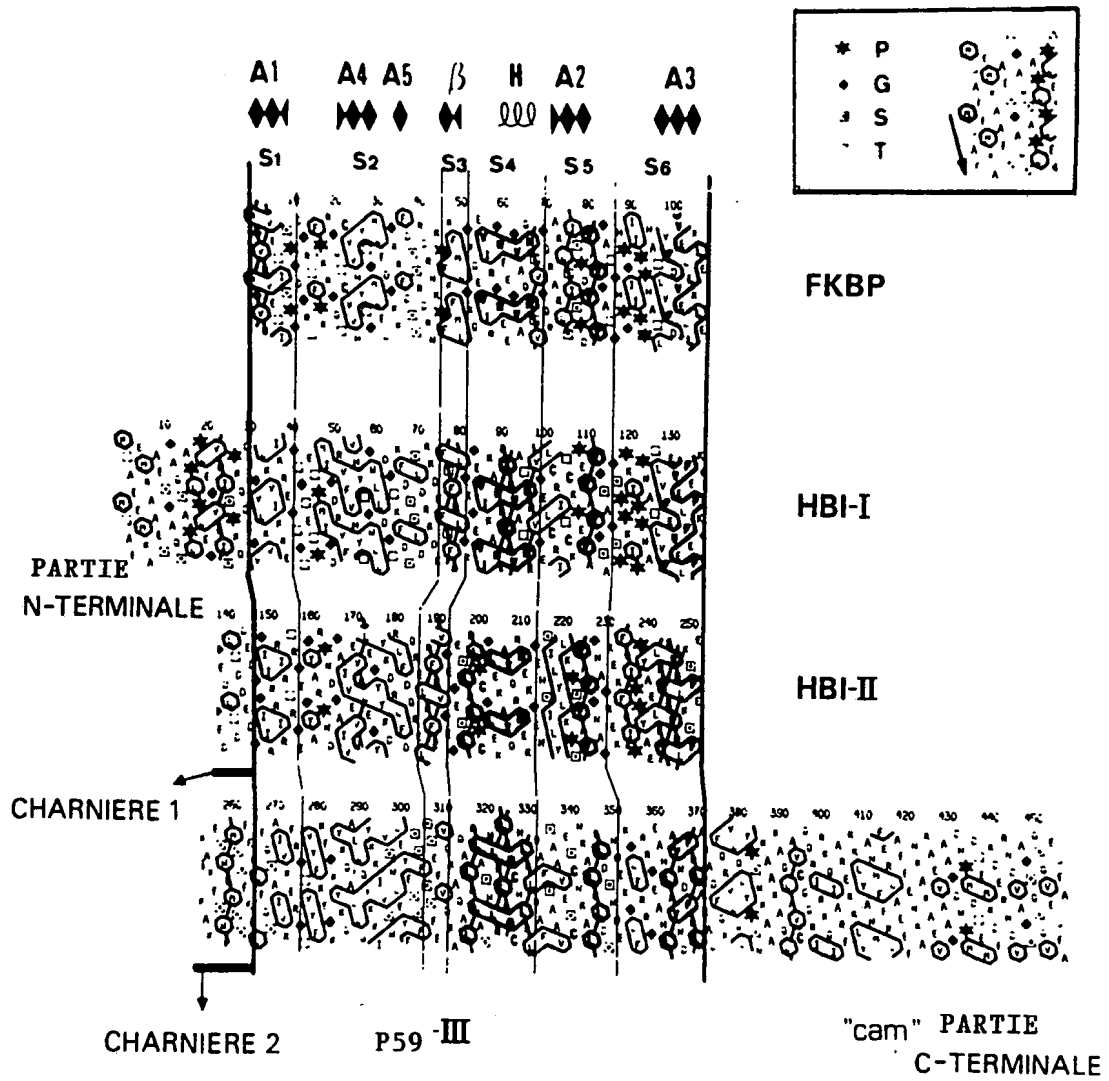
HBI-I

HBI-II

*RBP1 (S.cerevisiae)**FKBP (N.crassa)**C114 (N.meningitidis)**hyp. 25,3 kd (P.aeruginosa)**mip (L.pneumophila)**L2 (C.trachomatis)*

4/9

FIGURE 3



FEUILLE DE REMPLACEMENT

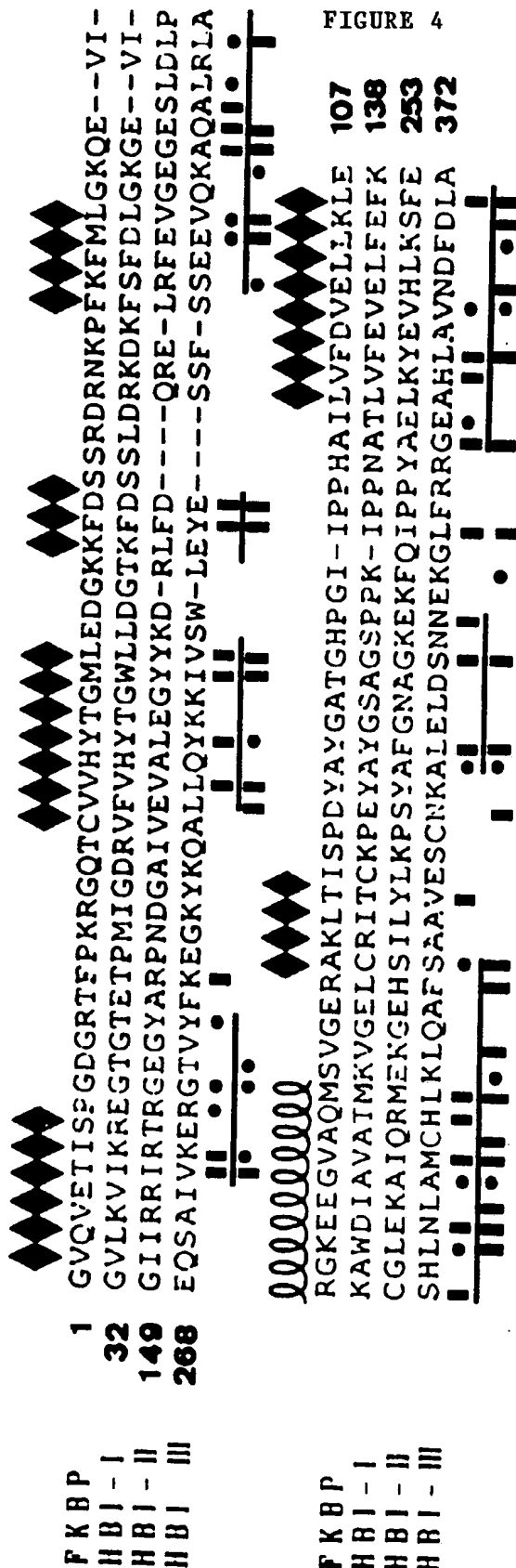


FIGURE 4

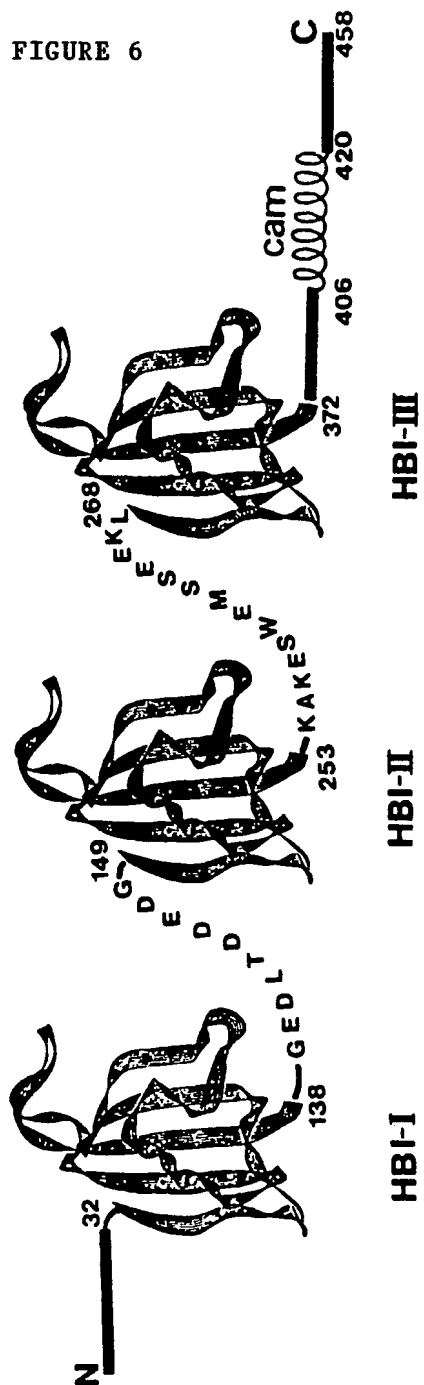
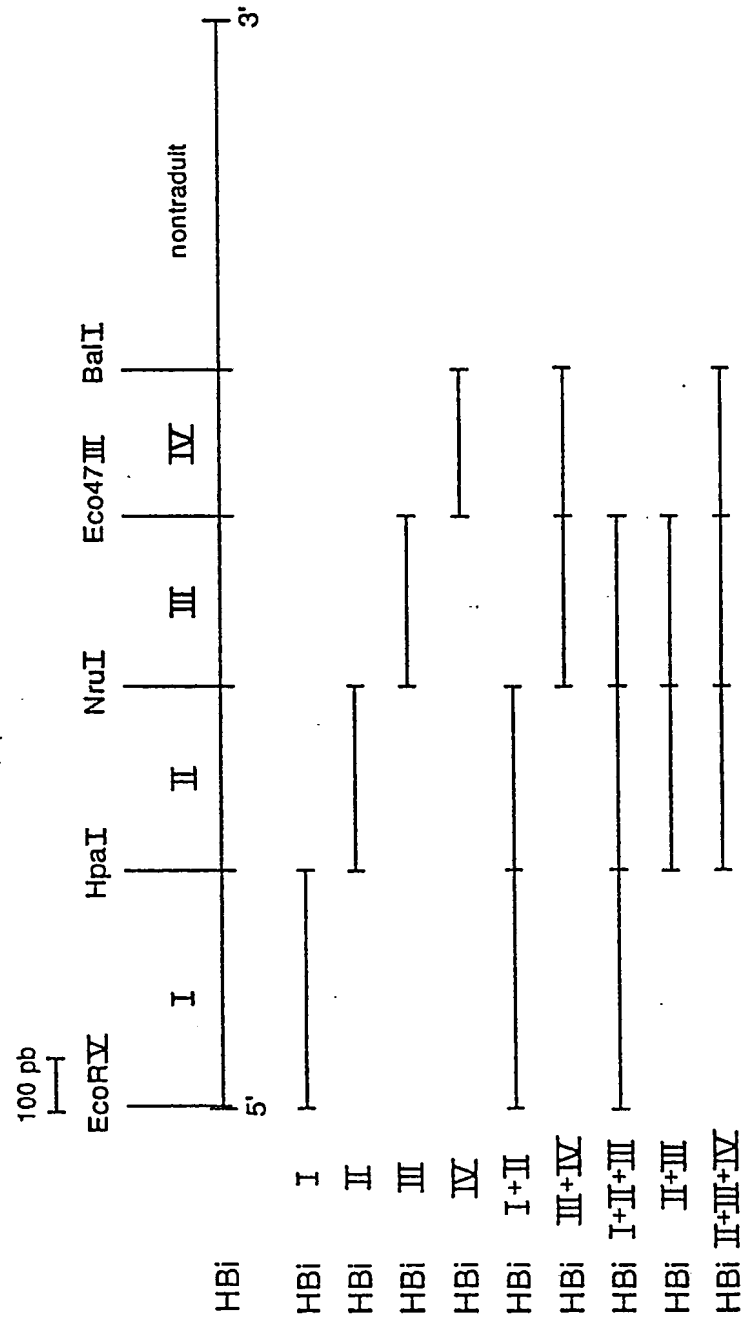
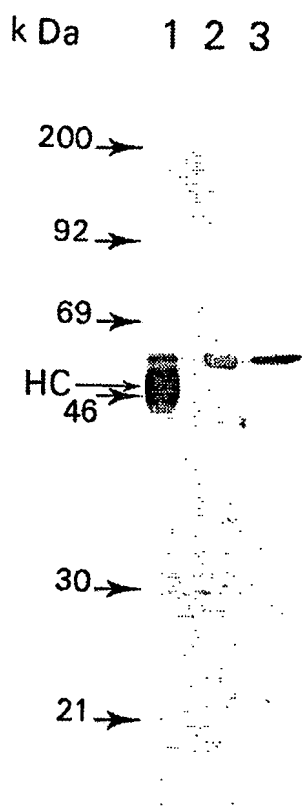


Figure 7



9/9

FIGURE 8



FEUILLE DE REMPLACEMENT